

トレーニングがもたらす骨格筋の腎保護作用

東京大学医学部附属病院 西 裕 志
(共同研究者) 同 南 学 正 臣
同 東 原 崇 明
同 小田原 幹

Training and Exercise Effect on The Kidney Diseases

by

Hiroshi Nishi, Masaomi Nangaku,
Takaaki Higashihara, Miki Odawara
Division of Nephrology and Endocrinology
The University of Tokyo Hospital

ABSTRACT

Chronic kidney disease is a serious health problem, and the effectiveness of exercise and training as prevention and treatment has not been fully verified particularly in terms of basic molecular biology and physiology. In this study, we employed a mouse model in which albuminuria induced by a high-fat diet is reduced by treadmill exercise as previously reported. We performed RNA sequencing combined with cluster enrichment analysis of mouse renal tissue with different diets and training programs, and found a group of genes related to inflammatory responses and stress responses that were upregulated by a high-fat diet and then downregulated by exercise. These genes include *Cxcl2*, which encodes chemoattractive chemokines which mainly affect neutrophils in inflammatory response. Therefore, we focus on their physiological effects and then performed immunohistological evaluation of neutrophil infiltration in kidney tissues

obtained from mice with high fat diet and/or exercise. However, unfortunately, no changes in cellular infiltration were observed in response to a high-fat diet or exercise. This does not deny other biological of the chemokine effect than we anticipated. Indeed, in chronic inflammation, the role of neutrophils is less well understood and has been described as either beneficial or detrimental, causing tissue damage and enhancing the immune response. Based on the results of this comprehensive study, we intend to further elucidate the renal receptor mechanisms associated with exercise and aim to provide basic scientific insights into the effects of training and exercise in chronic kidney disease.

キーワード

腎臓, 慢性腎臓病, 運動, マイオカイン

Keyword

kidney, chronic kidney disease, exercise, myokine

要旨

慢性腎臓病は深刻な健康課題であり、運動やトレーニングがその予防や治療として有効であるかの検証が十分に進んでいない。そこで今回、高脂肪食によって生じるアルブミン尿がトレッドミル運動によって減少するマウスモデルも用いて、腎組織のRNAシーケンスを行い、高脂肪食によって発現が亢進、運動をすることで逆に減少する遺伝子群として炎症反応やストレス応答に関連する遺伝子群を見出した。これにはケモカインをコードする*Cxcl2*も含まれており、その生理作用に着目して、腎臓組織内の好中球浸潤を免疫組織学的な評価を行った。しかし、高脂肪食や運動に伴う細胞浸潤の変化は認めなかった。今後さらに本研究の結果に基づいて、運動に伴う腎臓における受容機構を解明し、慢性腎臓病におけるトレーニング・運動の作用について基礎科学的な示唆を付与することを目指す。

緒言

慢性腎臓病は最終的に人工透析や腎移植を必要とする深刻な健康課題であり、医学的には一定期間続く血清クレアチニン値の上昇や尿検査の異常によって定義される。種々の薬物治療が実践される一方、近年では腎臓リハビリテーション（令和4年度診療報酬改定「透析時運動指導等加算」の新設、学会ガイドラインの制定、腎リハ指導士資格認定試験の開始）が進むなど、運動との関連が注目されている。

我々は第41回（2019年度）財団助成金の採択課題「トレーニングが慢性腎臓病の進行に与える影響の解析」において、肥満マウスによって生じるアルブミン尿（慢性腎臓病の代表的な病勢指標である）が習慣的なトレッドミル運動によって減少することを見出した。一方、免疫学的な腎炎モデルでは運動によるアルブミン尿の有意な変化は見られなかった。運動（骨格筋収縮）によって腎臓に変化が生じたメカニズムとしては、骨格筋から腎臓へのマイオカインなどによる直接的な作用、運動に伴う例えば脂肪減少や神経活動変化を介した腎臓への間接的な作用、の二つが主に考えられ

る。既報ではirisin^{1,2)}, FGF-21^{3,4)}, myonectin⁵⁾, FABP2⁶⁾等の報告が相次ぐが、例えばヒトでのirisinの作用については見解の決着を見ていない⁷⁻⁹⁾。近年のこうした研究動向からは依然として未知のマイオカイン分子が存在する可能性が示唆される。また、その発見・同定には既報のあるマイオカインのみに捉われずに、例えば近年発展を遂げている次世代シーケンスによるアン・バイアストな網羅的解析が大きな武器となりえる。

今回我々は運動によってマウス腎臓に生じている遺伝子発現変動を網羅的に解析することによって、運動がもたらす腎臓への効果の解明に挑んだ。

1. 方法

1.1 実験動物¹⁰⁾

6-8週齢雌性DBA/2Jclマウス (Japan CLEA, 東京, 日本) を使用した。マウスは空調設備及び12/12時間で空間内照明オン/オフが制御された環境で飼育した。飼料及び飲料水には自由摂取できるad libitumの状態にした。本研究において使用した全ての動物は東京大学大学院医学系研究科の実験動物規則に従い飼育、使用した。また、本研究は同動物実験委員会の審査、承認を受けて行った。

1.2 マウス運動負荷¹⁰⁾

マウス・ラット用トレッドミルシステムTMS-8B (Melquest, 富山, 日本) を使用した。走行傾斜角度0度, 電気刺激強度0.3mA, 走行速度0m/minで開始, 5分間で徐々に走行速度12m/minまで上昇して12m/minの固定速度で合計1時間走行後に自動終了するプログラムを設定した。これは76% VO_{2max}に相当しヒト高強度負荷に相当する。ただし、虚血症状が出現するVO_{2max} 80%を超えない。上記運動負荷を週5日, 各実験のプロトコールに応じた期間だけ与えた。

1.3 高脂肪食投与マウスモデル¹⁰⁾

上記の運動負荷を与え始めると同時に60 kcal%脂肪含有・ラード使用高脂肪食 (Research Diet, New Brunswick, NJ, USA) を8週間与えた。週2回すべての飼料を交換した¹⁰⁾。

1.4 RNAシーケンス

RNAの完全性はRNA 6000 Nano Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を用いてBioanalyzer (Agilent) で評価した。このRNAを用いて、NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina およびNEBNext Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を用いて、mRNAシーケンス用のライブラリーをメーカーの指示に従って作成した。次に、バイオアナライザーDNA 7500キット (Agilent) を用いて、ライブラリーの濃度とサイズ分布を測定した。すべてのサンプルは次世代シーケンス装置での解析に使用した。ライブラリーをプールし、濃度を10 nMに調整した。プールされたライブラリーは変性と中和を行い、さらに希釈した。その後、ライブラリーを1.7 pMに希釈し、NextSeq500/550 v2.5 (75 Cycles) キット (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて、NextSeq 500システム (Illumina) での次世代シーケンス解析に適用した。シーケンシングは36塩基ずつのペアエンドリードで行った。シーケンス後、FASTQファイルをエクスポートし、CLC Genomics Workbench 21.0.3ソフトウェア (QIAGEN, Venlo, Netherlands) で品質管理として、次世代シーケンス解析データの基本情報をチェックした。

1.5 定量PCR

RNAシーケンスに用いたマウス腎検体について、RNAiso Plus (TaKaRa, 滋賀, 日本) を用いて、製造元のプロトコールに従って全RNAを抽

出した。cDNAはPrime Script RTマスターミックス (TaKaRa) を用いて合成した。Cxcl2の定量的リアルタイムRT-PCR解析は、CFX96システム (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用い、THUNDERBIRD SYBR QPS-201 (Toyobo, 大阪, 日本) を用いて行った。各遺伝子増幅の閾値サイクル値は、Gapdhについて計算したCt値を差し引くことにより正規化した。

1. 6 免疫染色¹¹⁾

各マウスを吸入麻酔薬イソフルラン過剰吸入後の頸椎脱臼にて安楽死させ、両側腎臓を摘出した。摘出組織は中性ホルマリン固定液にて12時間浸漬固定後に70%エタノールで置換した。その後、パラフィン包埋し、厚さ4 μ mの連続切片を作製した。プロテイナーゼKで抗原賦活化した後、切片をブロックし、抗NIMP-R14抗体(1:100, Abcam, Cambridge, UK)と4°Cで一晩インキュベートしてビオチン化抗ラットIgG抗体(1:200, Vector Laboratories, Newark, CA, USA)と室温で40分間インキュベートした。ビオチン沈着はアビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体Vectastain ABC reagent (Vector Laboratories)とジアミノベンジジンで検出した。切片はヘマトキシリンで対比染色した。

1. 7 統計解析

特記されていない限り、データはドットプロット及び平均 \pm 標準誤差で表記した。P値 <0.05 を統計学的に有意とみなす水準とした。

2. 結果

今回のマウスモデルでは(高脂肪食+非運動)群は(通常食+非運動)群と比較して、8週間後までに体重とアルブミン尿は増加することと、さらに(高脂肪食+運動)群は(高脂肪食+非運動)群と比較して摂餌量に大きな変化は見られないもの

デサントスポーツ科学 Vol. 45

の、体重増加が緩やかとなり、アルブミン尿は減少することは以前に報告した¹⁰⁾。

これらのマウスについて安楽死の上で腎臓を採材してRNAを抽出し、RNAの分解が進んでいないことを確認した。RNAシーケンシングを行って(通常食+非運動)群から(高脂肪食+非運動)群で発現が上昇し、(高脂肪食+非運動)群から(高脂肪食+運動)群で発現が低下している遺伝子群の有無を探索した。その結果、非常に多岐にわたる複数の遺伝子が候補として同定されたため、エンリッチメント解析を行うことによって、発現遺伝子がコードする蛋白の既知の生理作用について解析を行った。そうしたところ、「炎症反応」「ストレス応答」「防御反応」に伴う遺伝子群が上位にヒットすることが明らかとなった。

次に、特に上位に登場した遺伝子のうち生理作用がよく知られるケモカインchemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2) をコードするCxcl2遺伝子に着目して定量PCRを行い、データの検証を行った。すると、(通常食+非運動)群から(高脂肪食+非運動)群での発現上昇 ($p = 0.12$, $n = 3$ each) や、(高脂肪食+非運動)群から(高脂肪食+運動)群での発現低下 ($p = 0.07$, $n = 3$ each) について、統計学的有意差には至らなかったもののその傾向が認められた(図1)。

CXCL2はケモカインとして白血球、特に好中球の走化性亢進や血管外浸潤を誘導する。一方、好中球は炎症の急性期に作動する免疫細胞の代表であり、炎症反応が生じていない平常状態のマウス腎臓では好中球浸潤は想定されない。このことから(通常食+非運動)群と比較して(高脂肪食+非運動)群では好中球が腎組織に分布しており、かつ、(高脂肪食+運動)群ではその好中球数が減少しているのではないかと仮説立てた。そこで、好中球病面分子であるNIMP-R14を標的とした免疫組織学的な評価を行ったところ、陽性コントロールであり腎臓の虚血障害モデルでは腎間

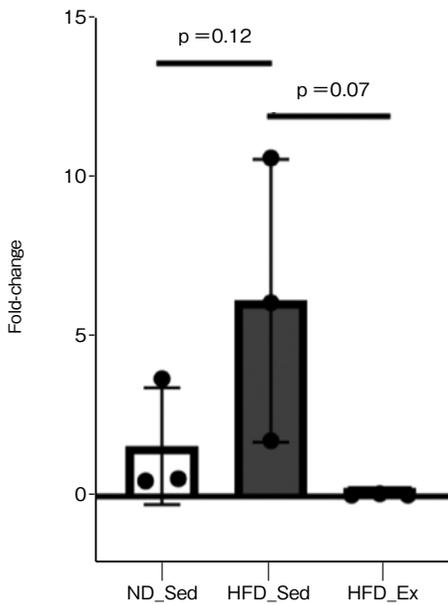


図1 マウス腎におけるCXCL2の遺伝子発現

質に好中球が染色されていることが確認できた。しかしながら、*Cxcl2* 遺伝子発現が亢進している（高脂肪食+非運動）群において、腎間質領域に好中球の浸潤を認めることはできなかった（図2）。

3. 考察

運動によって高脂肪食マウスのアルブミン尿が減少するメカニズムを採求するうえで、腎臓にお

ける遺伝子発現変化を網羅的に探索したところ、高脂肪食によって炎症反応やストレス応答の遺伝子群の発現が亢進し、さらに運動をすることでそれらが逆に減少することが明らかとなった。発現変化の著しかった遺伝子の一つとして*Cxcl2*が挙げられ、その古典的生理作用に着目して腎臓組織内の好中球遊走に着目して免疫組織学的な評価を行ったが、高脂肪食や運動に伴う明らかな細胞浸潤の変化は認めなかった。

本研究では（通常食+非運動）群、（高脂肪食+非運動）群、（高脂肪食+運動）群の各マウスから摘出された腎臓を用いた。運動が直接的、間接的であれ、効果器として腎臓にどのような分子レベルでの影響を与えているのか解析することは重要である。高脂肪食で腎臓における炎症・ストレス応答が上昇することは、登場する遺伝子や蛋白こそ違えどこれまでも多く報告されている^{12,13)}。しかし、特に白血球走化因子に着目して解析した研究は少なく、その多くは単球・マクドファージ系である^{12,14,15)}。

Cxcl2 遺伝子がコードする蛋白CXCL2はMip2-alpha (macrophage inflammatory protein 2-alpha: マクドファージ炎症性タンパク質2-a)としても知られる。CXCL2は主にマクドファージ、内皮細胞、上皮細胞、腫瘍細胞によって主に産生される^{16,17)}。CXCL2は特に中枢神経系の炎症におい



腎虚血障害



高脂肪食+非運動

図2 マウス腎の病理組織学的な変化（好中球の浸潤）

て、ミクログリアおよびアストロサイトから産生され循環好中球の浸潤を誘導する^{18, 19)}。このことから我々も高脂肪食負荷されたマウスの腎臓では炎症反応が亢進しており、好中球の組織評価を行ったが細胞浸潤に変化は見られなかった。

一般に好中球というと炎症の急性期に作用する炎症細胞と考えられているが、例えば一部の慢性的に持続する膠原病の基本病態に好中球が関与すること²⁰⁾や、急性炎症の遷延や瘢痕化に好中球の necroptosis や netosis 等の新しい細胞死が好中球プロテアーゼによる炎症性サイトカインの分解を修飾すること^{21, 22)}が指摘され始めている。従って、今回、好中球浸潤が目立たなかったことが必ずしも運動によって腎臓 CXCL2 の作用を全て検証できたわけではない。

今後、本研究における網羅解析の結果を利用して、腎臓におけるどのような受容体分子がこれらのシグナル応答を誘導するのかを解析していく。このためには同一モデルの骨格筋や血液サンプルの解析も必要であるし、また、肥満や脂質・糖代謝にかかわる一般的な変数の解析も必須である。今後の研究展開によって、腎臓病患者におけるトレーニングの重要性と科学的妥当性を供与すること目指していく。

4. 結 語

高脂肪食によって誘導される腎臓の障害（アルブミン尿）が習慣的運動によって減少する過程において、腎臓組織内での遺伝子発現にどのような変化が生じているのか、その一端が明らかとなった。今後も本研究を延伸させ得られた知見を公開・共有することで、国内に1,300万人以上いるとされる慢性腎臓病に対する実践的なアプローチとして社会整備が進むトレーニング・運動に対して基礎科学的な示唆を付与することを目指していく。

謝 辞

本研究は公益財団法人デサントスポーツ科学振興財団の助成を受けて実施されました。RNAシーケンス及びその解析は筑波大学医学医療系・菅澤威仁先生にご尽力ご指導をいただきました。ご支援ご協力をいただいた皆様に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Peng H., Wang Q., Lou T., Qin J., Jung S., Shetty V., Li F., Wang Y., Feng X.H., Mitch W.E., Graham B.H., Hu Z., Myokine mediated muscle-kidney crosstalk suppresses metabolic reprogramming and fibrosis in damaged kidneys., *Nat. Commun.*, **8** (1) :1493(2017)
- 2) Qiongyue Z., Xin Y., Meng P., Sulin M., Yanlin W., Xinyi L., Xuemin S., Post-treatment With Irisin Attenuates Acute Kidney Injury in Sepsis Mice Through Anti-Ferroptosis via the SIRT1/Nrf2 Pathway., *Front Pharmacol.*, **13**:857067(2022)
- 3) Geng L., Lam K.S.L., Xu A., The therapeutic potential of FGF21 in metabolic diseases: from bench to clinic., *Nat. Rev. Endocrinol.*, **16** (11) :654-67(2020)
- 4) Fisher F.M., Maratos-Flier E., Understanding the Physiology of FGF21., *Annu. Rev. Physiol.*, **78**:223-41(2016)
- 5) Little H.C., Rodriguez S., Lei X., Tan S.Y., Stewart A.N., Sahagun A., Sarver D.C., Wong G.W., Myonectin deletion promotes adipose fat storage and reduces liver steatosis., *FASEB J.*, **33** (7) :8666-87(2019)
- 6) Zhuang L., Mao Y., Liu Z., Li C., Jin Q., Lu L., Tao R., Yan X., Chen K., FABP3 Deficiency Exacerbates Metabolic Derangement in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure via PPARalpha Pathway., *Front Cardiovasc. Med.*, **8**:722908(2021)
- 7) Timmons J.A., Baar K., Davidsen P.K., Atherton P.J., Is irisin a human exercise gene? *Nature*. **488** (7413) :E9-10; discussion E-1(2012)
- 8) Albrecht E., Norheim F., Thiede B., Holen T., Ohashi T., Schering L., Lee S., Brenmoehl J., Thomas S., Drevon C.A., Erickson H.P., Maak S., Irisin - a myth rather than an exercise-inducible myokine., *Sci. Rep.*, **5**:8889(2015)

- 9) Arhire L.I., Mihalache L., Covasa M., Irisin: A Hope in Understanding and Managing Obesity and Metabolic Syndrome., *Front Endocrinol. (Lausanne)*, **10**:524(2019)
- 10) 西裕志, 東原崇明, 竹村浩至, 南学正臣 . トレーニングが慢性腎臓病の進行に与える影響の解析 . *デサントスポーツ科学*. **41** :126-34(2020)
- 11) Inoue R., Nishi H., Osaka M., Yoshida M., Nangaku M., Neutrophil Protein Kinase R Mediates Endothelial Adhesion and Migration by the Promotion of Neutrophil Actin Polymerization., *J Immunol.*, **208** (9) :2173-83(2022)
- 12) Szeto H.H., Liu S., Soong Y., Alam N., Prusky G.T., Seshan S.V., Protection of mitochondria prevents high-fat diet-induced glomerulopathy and proximal tubular injury., *Kidney Int.*, **90** (5) :997-1011(2016)
- 13) Yamamoto T., Takabatake Y., Takahashi A., Kimura T., Namba T., Matsuda J., Minami S., Kaimori J.Y., Matsui I., Matsusaka T., Niimura F., Yanagita M., Isaka Y., High-Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to Lipotoxicity in the Kidney., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **28** (5) :1534-51(2017)
- 14) Wang X.H., Mitch W.E., Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease., *Nat. Rev. Nephrol.*, **10** (9) :504-16(2014)
- 15) Yu S., Cheng Y., Zhang L., Yin Y., Xue J., Li B., Gong Z., Gao J., Mu Y., Treatment with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exerts anti-diabetic effects, improves long-term complications, and attenuates inflammation in type 2 diabetic rats., *Stem. Cell Res. Ther.*, **10** (1) :333(2019)
- 16) Sokol C.L., Luster A.D., The chemokine system in innate immunity., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **7** (5) (2015)
- 17) Zlotnik A., Yoshie O., The chemokine superfamily revisited., *Immunity.*, **36** (5) :705-16(2012)
- 18) Wu F., Zhao Y., Jiao T., Shi D., Zhu X., Zhang M., Shi M., Zhou H., CXCR2 is essential for cerebral endothelial activation and leukocyte recruitment during neuroinflammation., *J. Neuroinflammation.*, **12**:98(2015)
- 19) Yang T., Liu Y.W., Zhao L., Wang H., Yang N., Dai S.S., He F., Metabotropic glutamate receptor 5 deficiency inhibits neutrophil infiltration after traumatic brain injury in mice., *Sci. Rep.*, **7** (1) :9998(2017)
- 20) Nishi H., Mayadas T.N., Neutrophils in lupus nephritis., *Curr. Opin. Rheumatol.*, **31** (2) :193-200(2019)
- 21) Brostjan C., Oehler R., The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer., *Cell Death Discov.*, **6**:26(2020)
- 22) Perez-Figueroa E., Alvarez-Carrasco P., Ortega E., Maldonado-Bernal C., Neutrophils: Many Ways to Die., *Front Immunol.*, **12**:631821(2021)